

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2002-153272
(P2002-153272A)

(43)公開日 平成14年5月28日 (2002.5.28)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁸ (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 4 2
C 1 2 M 1/00		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 31/22	1 2 1 P 4 B 0 2 9
G 0 1 N 31/22	1 2 1	33/53	M 4 B 0 6 3
33/53		33/566	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O.L. (全 8 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願2000-358121(P2000-358121)

(71)出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(22)出願日 平成12年11月24日 (2000.11.24)

(71)出願人 390001421

学校法人早稲田大学

東京都新宿区戸塚町1丁目104番地

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許
出願 (産業再生法第30条の適用を受けるもの)

(72)発明者 田代 英夫

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(74)代理人 100086660

弁理士 鈴木 均

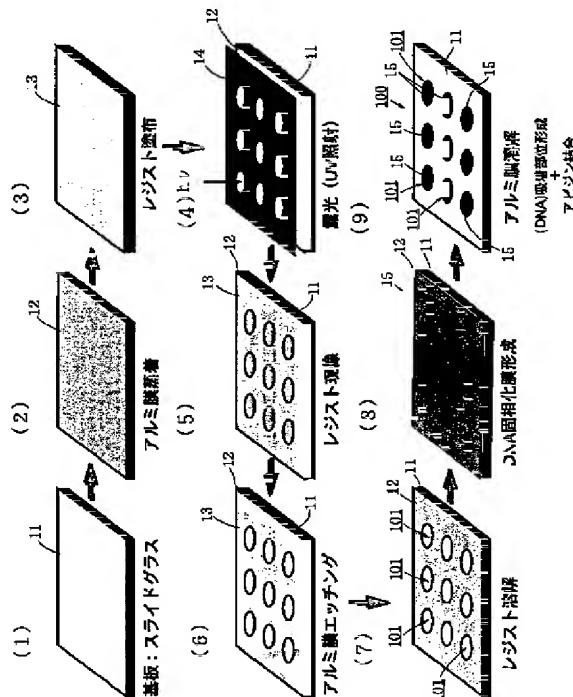
最終頁に統く

(54)【発明の名称】 生体分子マイクロアレイ

(57)【要約】

【課題】 定量的な解析に使用できる、S/N比の高い生体分子マイクロアレイを提供する。

【解決手段】 フォトリソグラフィ技術およびエッチング技術を用いて、スライドガラス基板11の表面のプローブ生体分子を付着させたい特定の部位101のみにアビシン分子が単層に固定された固相化膜14を形成することにより表面処理基板100を得る。特定の部位101の面積及び形状は全て均一であるため、各特定の部位101に固定されたビオチン分子の数もほぼ均一である。したがって各特定の部位101に結合するアビシン分子の数は同一になる。この表面処理基板100の各特定の部位101に、ビオチン化処理したプローブDNAを含む溶液をスポットすることにより、DNAマイクロアレイを得る。DNAマイクロアレイは、各特定の部位101に固定されているアビシン分子の数が同一であるので、各特定の部位101に結合するプローブDNA21の数も同一である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 プローブ生体分子を含む溶液を基板表面上にスポットすることにより、当該溶液中のプローブ生体分子が基板表面の特定の部位のみに受容され固定化されるように表面処理してなる基板であって、

前記基板表面のほぼ全面にわたり、前記プローブ生体分子を各々定量的に受容し得る複数の微細なプローブ生体分子受容固相部を規則的に設けたことを特徴とする生体分子マイクロアレイ用基板。

【請求項2】 前記プローブ生体分子受容固相部は、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、アミノ基、カルボニル基、水酸基、スクシニイド基、マレイド基、チオール基のうちのいずれかの固相化剤からなることを特徴とする請求項1に記載の生体分子マイクロアレイ用基板。

【請求項3】 前記基板は、ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板、金基板、銀基板のうちのいずれかであることを特徴とする請求項1または2に記載の生体分子マイクロアレイ用基板。

【請求項4】 前記プローブ生体分子受容固相部は、基板表面に結合したビオチン分子の末端にアビジン分子が単層に結合したものであることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の生体分子マイクロアレイ用基板。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の基板の前記プローブ生体分子受容固相部にプローブ生体分子が結合していることを特徴とする生体分子マイクロアレイ。

【請求項6】 前記プローブ生体分子は、DNA、RNA、PNAまたはタンパク質であることを特徴とする請求項5に記載の生体分子マイクロアレイ。

【請求項7】 前記プローブ生体分子はビオチンを標識した生体分子であり、前記プローブ生体分子受容固相部にビオチニアビジン結合により結合していることを特徴とする請求項5または6に記載の生体分子マイクロアレイ。

【請求項8】 請求項1～4のいずれかに記載の生体分子マイクロアレイ用基板を製造するための方法であって、

フォトリソグラフィ技術およびエッチング技術を用いて、特定の部位のみ前記プローブ生体分子受容固相部を設ける工程を含むことを特徴とする生体分子マイクロアレイ用基板の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本願発明は、検出すべきターゲット生体分子に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖の生体分子をプローブとし、当該プローブ生体分子と生体由来の試料核酸とのハイブリダイゼーションにより形成される二本鎖の有無を検出することによってターゲット生体分子を検出する生体分子検出技術に属し、特

に、プローブ生体分子を含む溶液を基板の表面にスポットすることにより当該基板上に生体分子検出スポット部を形成してなる生体分子マイクロアレイに関するものである。

【0002】

【従来の技術】 生体由来の試料中に存在する生体分子(DNA、RNAなど)を検出するためのデバイスとしてDNAマイクロアレイ(DNAチップともよばれる)がある。DNAマイクロアレイによれば、数百～数万回分の生体分子検出処理もしくは塩基配列決定処理を一括して並列的に行なうことが可能である。DNAマイクロアレイは、数平方センチメートル～十数平方センチメートルのガラス基板やシリコン基板上に数百～数万のDNA検出ポイント(スポット部)を整然と配置してなる。それぞれのDNA検出ポイントには予め既知の塩基配列を持った一本鎖の核酸ポリマー(遺伝子断片)がプローブ(検出子)として一種類ずつ固定されている。つまり、DNAマイクロアレイ上にはたくさんの種類の核酸プローブが整列している。このDNAマイクロアレイ上に、蛍光物質でラベリング(標識)した試料核酸の水溶液を流すと、試料核酸中の核酸ポリマーの塩基配列がプローブと相補的である場合のみ両者がハイブリダイズし、洗浄後も、DNAマイクロアレイ上にプローブとハイブリダイズしたターゲット核酸ポリマーだけが残存する。DNAマイクロアレイ上に残存したターゲット核酸ポリマー中の蛍光物質が発する蛍光を検出することにより、試料核酸中にターゲット核酸ポリマーが存在するか否かを判定できる。

【0003】 DNAマイクロアレイは、製造法によってフォトリソグラフィ型とスポットティング型の2種類に大別できる。フォトリソグラフィ型では、半導体集積回路の製造プロセスで用いられるフォトリソグラフィによって基板(あるいはシート)上で所望の多種類のDNA(オリゴヌクレオチド)を合成する製造方法がとられ、高密度のDNA検出ポイントを有するDNAマイクロアレイが実用化されている(米国特許5744305、5445934等参照)。一方、スポットティング型では、固相化剤(ポリリジンまたはアミノシラン)をスライドガラスの全面にコーティングした基板(あるいはシート)を用い、その基板上に、あらかじめ調製したプローブDNAを含む水滴を一つ一つスポットして載せた後、乾燥させることにより、DNA検出スポットを形成する製造方法がとられる(米国特許587522等参照)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 上述した2種類のDNAマイクロアレイには、以下のような特性の違いがある。フォトリソグラフィ型のDNAマイクロアレイは、DNA検出ポイントを細かくでき、DNAを均一に生やすことができるため、高い測定感度とその再現性を保証できる点、SNP(一塩基多型)分析に使用できる点で

優れている。しかしながら、マスクは1塩基合成するために1枚必要であり、塩基はA、T、G、Cと4種類あるので、少なくとも4枚のマスクが必要となる。たとえば20塩基の長さのプローブを合成するには80枚のマスクが必要である。マスクは1枚数十万円と高価であり、DNAマイクロアレイを作るためには数千万円の費用がかかる。このため、一部の研究機関でしか使用されていないのが現状である。

【0005】スポットティング型のDNAマイクロアレイは、プローブDNAを含む水滴を基板上に載せて乾かす方法を用いるため、基板上に固定されるDNAの密度と均一さが保証されない。すなわち、DNA検出スポット部の寸法や形状が不均一になるため、各DNA検出スポット部に固定されているDNA量にばらつきが生じる。このためスポットティング型のDNAマイクロアレイは、定性的な解析には使用できても、定量的な解析には向いていなかった。すなわち、ターゲット生体分子とのハイブリダイゼーションが生じたDNA検出スポット部の有無は検出できても、各DNA検出スポット部でハイブリダイゼーションしたターゲット生体分子の量を測定することはできなかった。また、DNA検出スポット部の周囲に付着した固相化剤の存在により、ターゲットDNAが非特異的に基板上に吸着し、ノイズの上昇を引き起こし、S/N比を低下させていた。本願発明は、このような事情の下に創案されたものであり、その目的は、定量的な解析に使用でき且つS/N比の高いスポットティング型の生体分子マイクロアレイを提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するためには、本願発明では以下の手段を採用する。本発明に係る生体分子マイクロアレイ用基板は、基板表面のほぼ全面にわたり、前記プローブ生体分子を各々定量的に受容し得る複数の微細なプローブ生体分子受容固相部を規則的に設けたことを特徴とする。本発明の生体分子マイクロアレイ用基板において、前記プローブ生体分子受容固相部は、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、アミノ基、カルボニル基、水酸基、スクシニイド基、マレイド基、チオール基のうちのいずれかの固相化剤からなる。また、前記基板は、ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板、金基板、銀基板のうちのいずれかである。また、前記プローブ生体分子受容固相部は、基板表面に結合したビオチン分子の末端にアビジン分子が単層に結合したものである。また、前記特定の部位の径は50~200ミクロン、前記特定の部位同士の間隔は100~500ミクロンであることが望ましい。ここで、前記特定の部位の径とは、当該特定の部位の形状が円形の場合は直径、正方形の場合は一片の長さを意味する。また、前記特定の部位の形状が、前記生体分子マイクロアレイの生体分子検出スポット部の撮像に使用する固体撮像素子の画素の形状と略一致していることが望ましい。

本発明に係る生体分子マイクロアレイは、請求項1~4のいずれかに記載の基板の前記プローブ生体分子受容固相部にプローブ生体分子を結合させたものであることを特徴とする。本発明の生体分子マイクロアレイにおいて、前記プローブ生体分子は、DNA、RNA、PNAまたはタンパク質である。また、前記プローブ生体分子はビオチンを標識した生体分子であり、前記プローブ生体分子受容固相部にビオチニーアビジン結合により結合している。本発明に係る製造方法は、前記生体分子マイクロアレイ用基板を製造する方法であって、フォトリソグラフィ技術およびエッチング技術を用いて、特定の部位のみ前記プローブ生体分子受容固相部を設ける工程を含むことを特徴とする。

【0007】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について図面を参照して詳細に説明する。まず、本発明に係るDNAマイクロアレイ用基板（以下、単に表面処理基板と記す。）について説明する。図1は本発明に係る表面処理基板の製造方法の一例を示す製造工程図である。図中、100は本発明に係る表面処理基板であり、この表面処理基板100は、プローブDNAが特定の部位101のみに付着するように表面処理してなる。表面処理基板100の製造工程は以下のとおりである。

（1）基板洗浄工程：スライドグラス基板11を洗浄し不純物を取り除く。

（2）アルミニウム膜蒸着工程：スライドグラス基板11の表面に、アルミニウム膜12を蒸着（コーティング）する。

（3）フォトレジストの塗布工程：アルミニウム膜12の表面にネガ型のフォトレジストを塗布（コーティング）する。

（4）露光工程：フォトマスク14を通して（3）の基板上の特定の部位101にのみ光（hν）を照射する。

（5）現像工程：（4）の基板上のフォトレジスト13を現像する。この段階で特定の部位101のフォトレジスト13が除去される。

（6）エッチング工程：（5）の基板上のアルミニウム膜をエッチングする。この段階で、特定の部位101のアルミニウム膜12が除去される。

（7）レジスト除去工程：（6）の基板上のフォトレジスト13をアセトンにより溶解し除去する。この段階で、スライドグラス基板11の表面が特定の部位101のみ露出する。

（8）DNA固相化膜形成工程：（7）の基板上に、プローブDNAを吸着し固相化する固相化剤を塗布し、DNA固相化膜15を形成する。この工程は、具体的には、アミノシラン処理による基板表面へのアミノ基導入工程と、ビオチニスクシニイドによる基板表面のアミノ基へのビオチン導入工程とからなる。

（9）DNA付着部位形成工程：（8）の基板上のアル

ミニウム膜12を酸、アルカリまたはキレート剤により溶解させて除去する。この段階で、スライドグラス基板11の表面の特定の部位101にのみDNA固相化膜15が形成される。

(10) アビジン結合工程：(9)の基板上にアビジン溶液を導入し、特定の部位101に形成されたDNA固相化膜15のビオチン分子の末端にアビジン分子を単層に結合させる。

以上の(1)～(10)の工程を経ることにより、スライドグラス基板11の表面の特定の部位101のみにアビジンが単層に固定されたDNAマイクロアレイ基板100が得られる。特定の部位101の直径は200ミクロン以下、特定の部位101同士の間隔は400ミクロン以下である。

【0008】図2に各DNA固相化膜15のビオチン分子の末端にアビジン分子が単層に結合する過程を示す。各基板の表面に形成される特定の部位101の面積及び形状は全て均一であるため、各特定の部位101に固定されたビオチン分子23の数もほぼ均一である。したがって、各特定の部位101に結合するアビジン分子の数は均等になる。すなわち、各特定の部位101に固定されたビオチンの数に多少ばらつきがあっても、アビジン分子の方がビオチン分子よりも遙かに大きいため、各特定の部位101に固定されるアビジン分子の数は一定になる。特定の部位101の形状や寸法、特定の部位101同士の間隔は、露光工程で使用するフォトマスクを変えることによって任意に変更できる。したがって、特定の部位101に固定するアビジン分子の数も、フォトマスクを変えることによって任意に制御できる。

【0009】次に、本発明に係るDNAマイクロアレイについて説明する。本発明に係るDNAマイクロアレイは、図1の方法で製造された表面処理基板100の各特定の部位101に、各々塩基配列の異なるプローブDNAを含む溶液をスポットすることにより製造される。図3に本発明に係るDNAマイクロアレイの製造方法の一例を示す。図中、110はプローブDNA21を含む溶液111をDNAマイクロアレイ基板100上にスポットするためのアレイヤである。プローブDNA21には、予めビオチンを標識したDNA(ビオチン化DNA)を使用する。アレイヤ110は、毛細管作用により溶液111を一定量保持できるようになっており、溶液111を保持したアレイヤ110の先端を表面処理基板100上の特定の部位101に突き当てるにより、一定量の溶液111が特定の部位101に供給される。その結果、溶液111中のプローブDNA21がDNAマイクロアレイ基板100上の特定の部位101に固定されている各アビジン分子22に1つずつ結合する(ビオチン化DNAの固相化)。各特定の部位101に固定されているアビジン分子22の数は同一であるので、各特定の部位101に結合するプローブDNA21の数も

同一である(図4参照)。各特定の部位101に固定するアビジン分子の数は、上述したように、露光工程で使用するフォトマスクを変えて特定の部位101の形状や寸法を変更することにより任意に変更できる。したがって、各特定の部位101に固定するプローブDNA21の数も、露光工程で使用するフォトマスクの変更により任意に制御でき、各特定の部位101にスポットする溶液111のプローブDNA濃度にばらつきがあっても、常に一定数のプローブDNA21を各特定の部位101に固定することができる。

【0010】図5に表面処理基板上の特定の部位にスポットする溶液中のDNA量(濃度)と特定の部位に固定化されるDNA量との関係の測定例を示す。この測定結果から、 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 個のプローブDNAをスポットすれば特定の部位に固定化されるプローブDNA量が一定になることがわかる。DNAマイクロアレイ上のDNA検出スポット部は、全て同一形状、同一面積であり、しかも全検出スポット部に同数ずつプローブDNA21が固定されているので、このDNAマイクロアレイによれば定量的な解析が可能になる。DNAマイクロアレイにおけるDNA吸着部位が特定の部位101すなわちDNA検出スポット部のみに制限されるので、DNA検出スポット部の周囲にDNAが非特異的に吸着を起こすのを防止できる。したがって、蛍光検出時のノイズ(不要光)の減少により、S/N比を向上させることができる。さらに、DNA検出スポット部の形状すなわち前記特定の部位の形状を、撮像に使用する固体撮像素子(CCDセンサ、CMOSセンサなど)の画素の形状と一致させておくことにより、S/N比をより向上させることができる。

【0011】なお、本発明は以上の実施の形態に限定されるものではない。たとえば、本発明に係る表面処理基板の製造方法は上記の実施の形態に限定されない。すなわち、図1に示した製造方法では、基板11の表面に、先ずアルミニウム膜12、ポジ型のフォトレジスト13を順次積層する。次に特定の部位101を規則的に配列してあるフォトマスクを通して、フォトレジストの特定の部位のみ露光し、現像液に浸することで、特定の部位101のみフォトレジストが溶解し、特定の部位101のみアルミニウム膜12が露出する。その後、アルミニウム膜12を酸性のエッティング溶液によりエッティングすることにより、特定の部位101のアルミニウム膜12が溶解され、基板11の特定の部位101のガラス表面が露出する。その上にDNA固相化膜15を塗布し、アルミニウム膜12を溶解することにより、基板11の表面の特定の部位101にのみDNA固相化膜15を残すことができる。別な方法として、基板11の表面全体に最初からDNA固相化膜15を形成し、特定の部位101のみDNA固相化膜15を露出させる方法を採用してもよい。この場合には、基板11の表面全体にDNA固相

化膜15およびアルミニウム膜12を順次積層形成した後、アルミニウム膜12上にポジ型のフォトレジスト13を積層形成し、フォトマスクを通して特定の部位101にのみ露光し、上記と同じように、現像とエッチングとを行うことにより、特定の部位101のみDNA固相化膜15を露出させることができる。また、フォトレジストはポジ型である必要はなく、ネガ型のフォトレジストも使用可能であることは無論である。

【0012】また、上記実施の形態では、DNAマイクロアレイ、すなわちプローブ生体分子としてDNAを固定した生体分子マイクロアレイについて説明したが、プローブ生体分子としてRNA、PNA、蛋白質などを用いたものも本発明の生体分子マイクロアレイに含まれる。また、表面処理基板に用いる基板は、スライドグラス基板に限るものではなく、透明ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板、金基板、銀基板などでもよい。また、固相化剤に付いても、アビジンを固定（露出）したものに限らず、前記特定の部位に固定化したいプローブ生体分子との結合性を考慮して、固定化するプローブ生体分子数の定量化に最も適切と思われる物質を使用すればよい。

【0013】

【発明の効果】以上説明したように、本発明は以下のような優れた効果を奏する。本発明に係る生体分子マイクロアレイ用基板は、プローブ生体分子が基板表面の特定の部位のみに付着するように表面処理されているので、プローブ生体分子を含む溶液を基板表面にスポットすることにより、生体分子検出スポット部の外の領域にプローブ生体分子が付着するのを防止して、S/N比の高い生体分子マイクロアレイを得ることができる。また、前記特定の部位の面積及び形状を変えることにより、生体分子検出スポット部に固定化するプローブ生体分子の量を制御することができる。前記特定の部位の面積及び形状を全て同一とすれば、全生体分子検出スポット部のプローブ生体分子の量を一定にすることができ、本発明に係る生体分子マイクロアレイが得られる。本発明に係る生体分子マイクロアレイによれば、各生体分子検出スポット部に固定化されているプローブ生体分子の量が一定

であるので、ターゲット生体分子の定量的な解析に使用できる。また、プローブ生体分子を特定の部位に固定化することで生体分子検出スポット部が形成されているので、生体分子検出スポット部の外の領域におけるターゲット生体分子の非特異的吸着を防止し、S/N比の高い測定を行うことができる。本発明に係る製造方法によれば、プローブ生体分子を吸着し固相化する固相化膜をフォトリソグラフィなどの精密加工技術を用いて基板表面の特定の部位のみに形成することにより、本発明に係る生体分子マイクロアレイ用表面処理基板を高精度に製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る表面処理基板の製造方法の一例を示す製造工程図である。

【図2】各DNA固相化膜のビオチン分子の末端にアビジン分子が結合する過程に関する説明図である。

【図3】本発明に係るDNAマイクロアレイの製造方法の一例を示す説明図である。

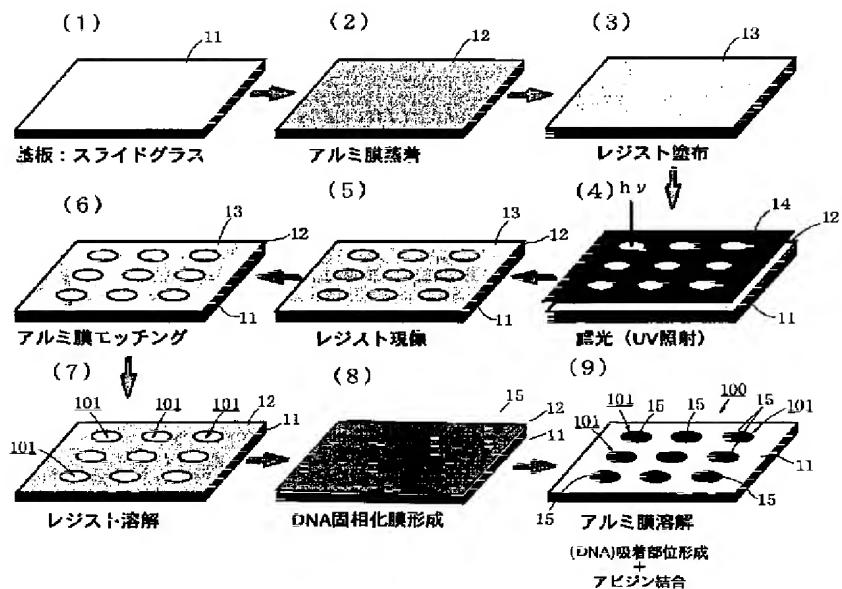
【図4】特定の部位に固定されているアビジン分子にプローブDNA（ビオチン化DNA）が結合する過程に関する説明図である。

【図5】表面処理基板上の特定の部位にスポットする溶液中のDNA量（濃度）と特定の部位に固定化されるDNA量との関係の測定結果を示す図である。

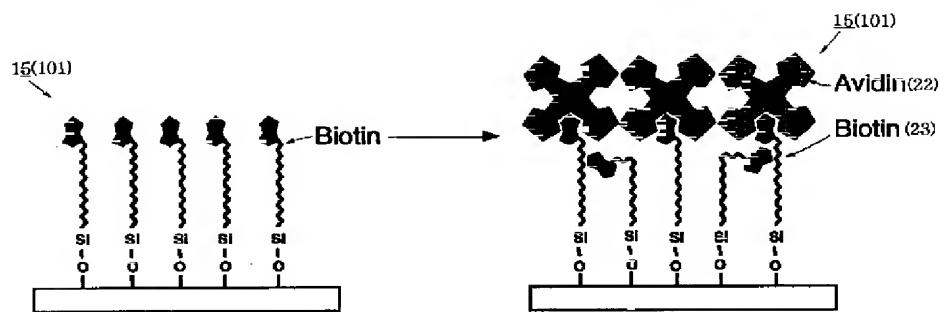
【符号の説明】

- 1 1 : スライドグラス基板
- 1 2 : アルミニウム膜
- 1 3 : フォトレジスト
- 1 4 : フォトマスク
- 1 5 : 固相化膜
- 2 1 : プローブDNA
- 2 2 : アビジン分子
- 2 3 : ビオチン分子
- 1 0 0 : DNAマイクロアレイ表面処理基板
- 1 0 1 : 特定の部位
- 1 1 0 : アレイヤ
- 1 1 1 : 溶液

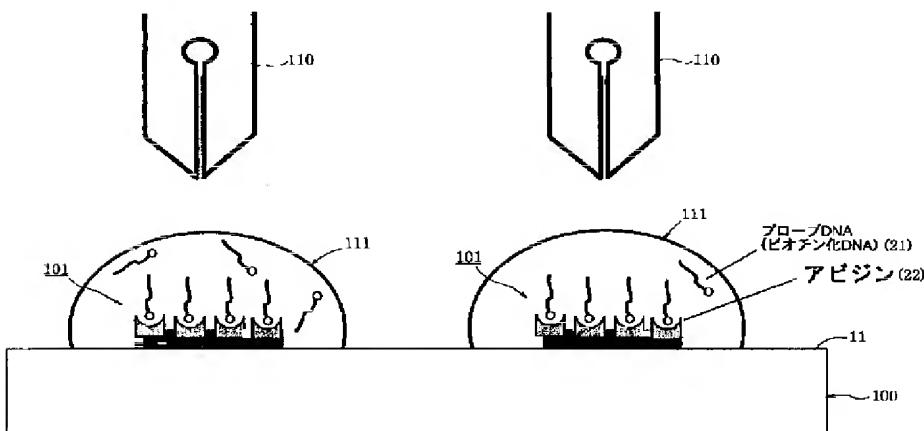
【図1】



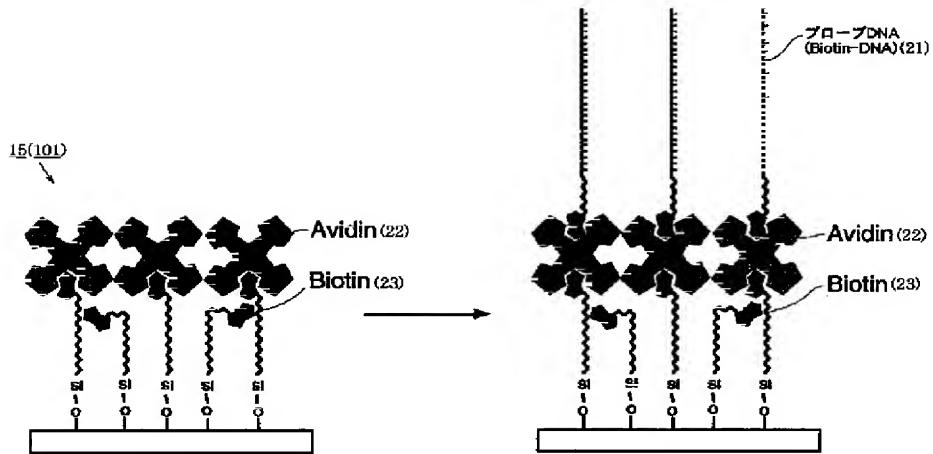
【図2】



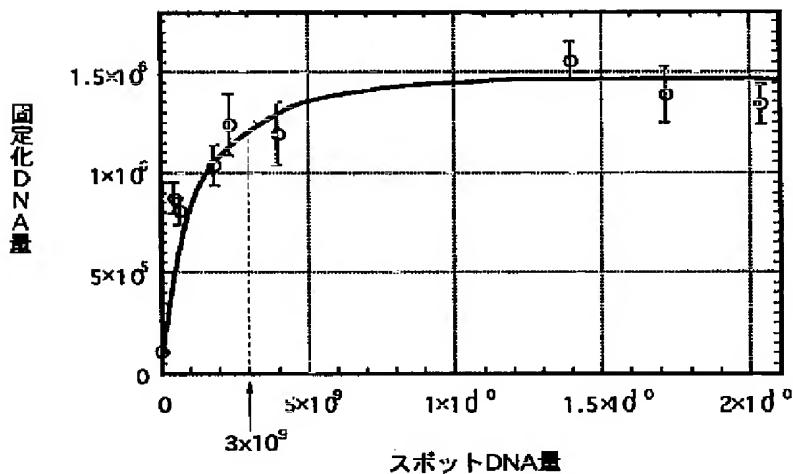
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	(参考)
G 01 N 33/566		G 01 N 37/00	1 0 2
37/00	1 0 2	C 12 N 15/00	F
(72) 発明者 近藤 恭光		(72) 発明者 松本 和子	
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所 内		東京都新宿区戸塚町1丁目104番地 学校 法人早稲田大学内	
(72) 発明者 橘内 徳司		(72) 発明者 野島 高彦	
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所 内		東京都新宿区戸塚町1丁目104番地 学校 法人早稲田大学内	
(72) 発明者 竹中 繁織			
福岡県古賀市舞の里4丁目23-21			

!(8) 002-153272 (P2002-153272A)

F ターム(参考) 2G042 AA01 BD19
4B024 AA20 HA14
4B029 AA23 BB20 CC03
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ52
QR55 QR82 QS34